

# POTENSI PHOTODINAMIK INAKTIVASI *Staphylococcus aureus* DAN *Vibrio cholerae* DENGAN ENDOGEN PHOTOSENSITIZER PADA PENYINARAN LED BIRU ( $430 \pm 4$ ) nm DAN MERAH ( $629 \pm 6$ ) nm

Suryani Dyah Astuti\*, Djoni Izak R\*, Ni'matuzahroh\*, M. Zainuddin\*\*, Suhariningsih\*

\*Departemen Fisika FSaintek Universitas Airlangga

\*\*Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Kampus C Unair Jl. Mulyorejo Surabaya

E-mail: suryanidyah@yahoo.co.id

## ABSTRAK

*Photodynamic Inactivation (PDI) is bacteria inactivation method with using light and bacteria porphyrin photosensitizer. The combination of light and photosensitizer with suitable spectrum can promote photosensitization process and then cause bacteria photodamage. This research was laboratory experiment, to analyze photodamage potency of Gram positive bacteria Staphylococcus aureus and Gram negative Vibrio cholera with combination of endogen photosensitizer and LED exposure (blue LED ( $430 \pm 4$ ) nm and red LED ( $629 \pm 6$ ) nm)) on Pulse Width Modulation (PWM) 75% and time duration 30 minutes. The viability of bacteria had been counted after 48 hours incubation on temperature  $37^{\circ}\text{C}$  by using Total Plate Count (TPC). Result of this research showed that blue LED exposure ( $430 \pm 4$ ) nm had potency to decrease 70% Staphylococcus aureus and 50% Vibrio cholera bacteria colony forming unit. Red LED ( $629 \pm 6$ ) nm exposure decreased 22% dan 3% colony forming unit. So blue LED exposure had big potency to bacteria inactivate.*

**Key words:** blue and red LED exposure, Photodynamic Inactivation, porphyrin photosensitizer, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*

## PENGANTAR

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif, berbentuk bola dengan garis tengah sekitar 1  $\mu\text{m}$ , tersusun dalam kelompok tak beraturan yang nampak seperti sekumpulan anggur jika dilihat dengan mikroskop. *Vibrio cholerae* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang bengkok yang tumbuh dalam media aerob pada suhu optimum pertumbuhan  $18\text{--}37^{\circ}\text{C}$ . Kedua bakteri memiliki dinding sel yang mengandung dua komponen utama, yaitu peptidoglikan dan asam teikhoat (Jawetz *et al.*, 2001). Metode inaktivasi pada bakteri umumnya menggunakan antibiotik (Juanda, 2005), namun penggunaan yang tidak tepat dalam jangka waktu lama menyebabkan bakteri menjadi resisten (James, 2007), sehingga perlu dicari metode alternatif yang bersifat efektif dan selektif membunuh bakteri. *Photodynamic Inactivation (PDI)* merupakan bagian dari photodinamik terapi untuk aplikasi pada mikroba (Hamblin dan Hasan, 2004). Kombinasi cahaya dan photosensitizer tertentu pada PDI akan menyebabkan kerusakan (*photodamage*) dan inaktivasi pada bakteri.

Secara alamiah beberapa bakteri menghasilkan endogen porphyrin *photosensitizer* sebagai molekul penyerap cahaya (Kennedy dan Pottier, 1992). Nitzan *et al.* (2004) melaporkan bahwa porphyrin utama pada strain bakteri

Gram positif *Staphylococci* adalah jenis *coproporphyrin* (68,3–74,6%) dan strain bakteri Gram negatif *Bacillus cereus* jenis porphyrin utamanya adalah *uroporphyrin* (75,8%). Spektrum serap dari masing-masing jenis porphyrin bersifat spesifik. Untuk kebanyakan jenis *porphyrin*, absorpsi terjadi pada daerah cahaya tampak dengan panjang gelombang 400–750 nm (Juzenas, 2002). *Uroporphyrin III* dan *Coproporphyrin III* mempunyai kemampuan optimal menyerap cahaya pada panjang gelombang cahaya biru (407–450) nm (Nitzan dan Ashkenazi, 2001).

Sumber cahaya yang memiliki rentang spektrum absorpsi *porphyrin photosensitizer* antara lain LED (*Light-emitting diode*). LED merupakan semikonduktor kompleks yang dapat mengkonversi secara efisien energi listrik menjadi cahaya (Schubert, 2006), menghasilkan sejumlah kecil panas dalam cahaya yang ditimbulkan, memiliki *life time* yang lama dan dapat dimodulasi dengan kecepatan tinggi (Ross, 1979). LED menghasilkan cahaya dengan berbagai warna. Warna cahaya yang diemisikan oleh LED bergantung pada komposisi material semikonduktor yang digunakan, baik infra merah, cahaya tampak maupun ultraviolet.

Hasil penelitian Papageorgiou *et al.* (2000) menunjukkan bahwa penyinaran cahaya yang memiliki spektrum

panjang gelombang yang sesuai dengan spektrum serap *photosensitizer* bakteri dengan dosis energi penyinaran yang tepat dapat menimbulkan *photodamage* pada bakteri. Spektrum serap porphyrin type *photosensitizer* berada pada panjang gelombang 400–450 nm (Papageorgiou *et al.*, 2000). Mekanisme *photodamage* pada bakteri melibatkan proses fotosensitisasi, yaitu proses penyerapan cahaya oleh suatu molekul *photosensitizer* yang bersifat peka terhadap cahaya yang selanjutnya mengaktivasi reaksi dalam suatu substrat. Fotosensitisasi bergantung pada jenis dan kuantitas dari *porphyrin* yang berperan sebagai molekul pengabsorpsi cahaya (Nitzan *et al.*, 2004) dan kesesuaian spektrum cahaya dengan spektrum absorpsi *photosensitizer* (Papageorgiou, 2000).

Mekanisme fotosensitisasi meliputi penyerapan cahaya (proses fotofisika) dan aktivasi molekul porphyrin *photosensitizer* bakteri, diikuti reaksi fotokimia yang menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif. Produk radikal ini menyebabkan *photodamage* bakteri karena kerusakan membran sitoplasmik, berupa kebocoran isi sel atau inaktivasi sistem transport membran dan enzim pada sel bakteri tersebut (Hamblin dan Hasan, 2004).

Hasil penelitian Astuti *et al.* (2009) menghasilkan instrumen LED biru 454 nm yang dapat digunakan untuk inaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan menguji potensi *photodamage* bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio cholerae* dengan penyinaran LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm dan merah ( $629 \pm 6$ ) nm PWM 75% 30 menit.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel penelitian adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P dan kultur murni bakteri *Vibrio cholerae* koleksi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bahan dan peralatan laboratorium yang digunakan adalah garam fisiologis, *Nutrient Broth* (Pronadisa), *Staphylococcus* agar (Pronadisa), media TCBS (*Thiosulphate Citrate Bile Sucrose*) (Oxoid), seperangkat alat sterilisasi, kultur, dan penghitungan bakteri yaitu, otoklaf, laminar, shaker inkubator, spektroskopi UV-Vis dan *Quebec Colony Counter*.

### Peralatan Penyinaran

Peralatan penyinaran adalah instrumen sumber cahaya LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm dan merah ( $629 \pm 6$ ) nm untuk penyinaran bakteri secara *in vitro* yang dilengkapi dengan mikrokontroler tipe AVR 8535 untuk pengaturan lama waktu penyinaran dan daya LED, motor servo merk Parallax Continuous yang memutar holder sampel untuk

meratakan penyinaran, sensor suhu tipe LM 35 untuk mengendalikan suhu ruang tetap konstan serta display LCD untuk menampilkan PWM penyinaran, timer sesuai dengan input lama waktu yang diberikan, dan suhu ruangan yang dideteksi oleh sensor suhu.

### Pertumbuhan Bakteri

Bakteri ditumbuhkan pada media *Nutrien Broth* steril selama 18 jam pada shaker inkubator temperatur  $37^\circ \text{C}$ . Sebanyak 2 ml kultur diencerkan 50 kali dengan larutan garam fisiologis steril sampai diperoleh nilai absorbansi  $A_{600} = 0,40\text{--}0,46$ . Selanjutnya 2 ml suspensi tiap sampel bakteri dimasukkan dalam cawan plastik steril diameter 3,5 cm, siap untuk disinari.

### Penyinaran Bakteri dengan LED

Cawan petri berisi bakteri diletakkan pada holder sampel. Jarak antara LED dengan cawan dibuat tetap, yaitu 2 cm. Penyinaran LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm dan merah ( $629 \pm 6$ ) nm dilakukan pada PWM 75% dan lama waktu penyinaran 30 menit. Replikasi untuk kelompok penyinaran dilakukan 10 kali, disertai dengan kelompok kontrol tanpa penyinaran. Selanjutnya bakteri ditumbuhkan pada media *Staphylococcus* Agar untuk *Staphylococcus aureus* dan media TCBS untuk bakteri *Vibrio cholerae*.

### Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri

Penghitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh dengan metode pencawanan (*Total Plate count*) menggunakan *Quebec Colony Counter*. Persentase penurunan jumlah koloni bakteri yang tumbuh:  $|\Sigma \text{koloni perlakuan} - \Sigma \text{koloni kontrol}| / \Sigma \text{koloni kontrol} \times 100\%$

### Analisis Statistik

Analisis data menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Package For Social Science*) berupa uji T dua sampel bebas, untuk mengetahui perbedaan penyinaran dengan LED biru dan merah.

## HASIL

Pengukuran performansi LED menghasilkan panjang gelombang LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm dan merah ( $629 \pm 6$ ) nm dengan alat ukur Wavelength Meter SR 530 Stanford Research System Inc. dan kalibrator He-Ne laser 543 nm Newport 81I. Pengukuran performansi alat pengukur temperatur dengan kalibrator termometer digital *Atech Thermo* L87AD menghasilkan nilai  $R^2 = 0,9995$  dan lama waktu penyinaran dengan kalibrator Stopwatch Digital Enko Sport Timer menghasilkan nilai  $R^2 = 1$ .

Pengukuran intensitas daya penyinaran LED menghasilkan daya penyinaran yang berada pada rentang mW. Data jumlah koloni bakteri yang tumbuh ditunjukkan pada Tabel 1 dan 2.

**Tabel 1.** Data jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada penyinaran LED biru dan merah daya PWM 75% dan waktu penyinaran 30 menit

| No     | Koloni Bakteri (CFU/ml) |               |                | % penurunan CFU |                |
|--------|-------------------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
|        | kontrol                 | Treatmen biru | Treatmen merah | Treatmen biru   | Treatmen merah |
| 1      | 225                     | 65            | 175            | 71,62           | 23,8           |
| 2      | 228                     | 69            | 180            | 69,33           | 20             |
| 3      | 231                     | 72            | 185            | 68,42           | 18,86          |
| 4      | 216                     | 64            | 186            | 72,29           | 19,48          |
| 5      | 245                     | 68            | 177            | 68,52           | 18,06          |
| 6      | 237                     | 70            | 179            | 71,43           | 26,94          |
| 7      | 243                     | 77            | 188            | 67,51           | 20,68          |
| 8      | 223                     | 67            | 171            | 72,43           | 29,63          |
| 9      | 237                     | 73            | 176            | 67,26           | 21,08          |
| 10     | 225                     | 66            | 184            | 72,15           | 22,37          |
| Rerata | 231,4                   | 69            | 180            | 70,10           | 23,58          |

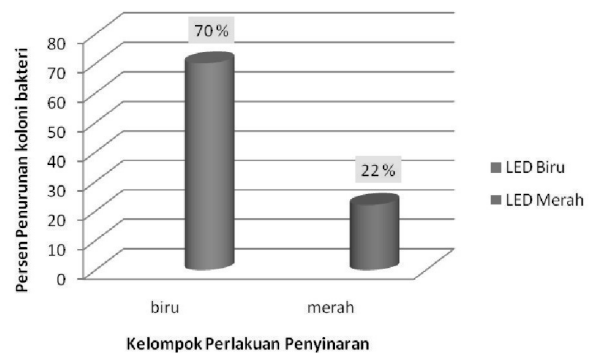
**Tabel 2.** Data jumlah koloni bakteri *Vibrio cholera* pada penyinaran LED biru dan merah daya PWM 75% dan waktu penyinaran 30 menit

| No     | Koloni bakteri (CFU/ml) |               |                | % penurunan CFU |                |
|--------|-------------------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
|        | kontrol                 | Treatmen biru | Treatmen merah | Treatmen biru   | Treatmen merah |
| 1      | 108                     | 54            | 104            | 50              | 3,74           |
| 2      | 115                     | 55            | 113            | 52,17           | 1,74           |
| 3      | 112                     | 58            | 108            | 48,21           | 3,57           |
| 4      | 111                     | 57            | 109            | 48,65           | 1,80           |
| 5      | 109                     | 53            | 104            | 51,38           | 4,59           |
| 6      | 108                     | 54            | 106            | 50              | 1,85           |
| 7      | 114                     | 52            | 108            | 54,39           | 5,26           |
| 8      | 112                     | 56            | 110            | 50              | 1,79           |
| 9      | 113                     | 56            | 110            | 50,44           | 2,66           |
| 10     | 109                     | 58            | 106            | 46,79           | 2,75           |
| Rerata | 111                     | 55            | 109            | 50,20           | 2,97           |

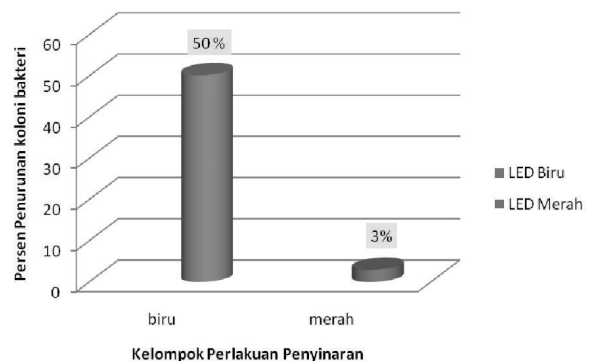
Pada output Independent Samples Test menunjukkan bahwa data persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio cholera* memiliki variansi homogen yang ditunjukkan pada *Levene's test for equality of variances*. Sedangkan hasil uji *t-test* menunjukkan adanya perbedaan antara penyinaran dengan LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm dan merah ( $629 \pm 6$ ) nm terhadap pertumbuhan jumlah koloni bakteri.

Diagram persentase penurunan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada penyinaran LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm dan

merah ( $629 \pm 6$ ) nm dengan daya PWM 75% dan waktu penyinaran 30 menit ditunjukkan pada Gambar 1 dan 2.



**Gambar 1.** Diagram persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada penyinaran LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm dan merah ( $629 \pm 6$ ) nm



**Gambar 2.** Diagram persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada penyinaran LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm dan merah ( $629 \pm 6$ ) nm

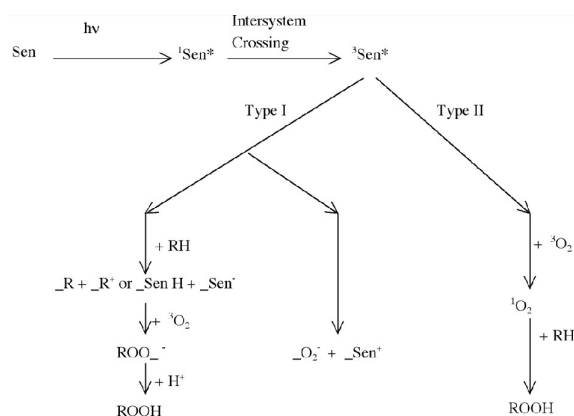
## PEMBAHASAN

Hasil pengukuran performansi instrumen sumber cahaya LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm dan merah ( $629 \pm 6$ ) nm yang meliputi uji ketepatan dan ketelitian alat pengukur temperatur dan lama waktu penyinaran pada instrumen LED diperoleh nilai  $R^2 = 1$  untuk lama waktu penyinaran dan  $R^2 = 0.9995$  untuk pengukur temperatur, yang berarti bahwa alat pengukur temperatur dan lama waktu penyinaran pada instrumen LED yang dirancang memiliki ketepatan dengan kalibrator. Interaksi fotokimia pada fotodinamik terjadi pada durasi waktu paparan  $> 1$  s dengan rapat daya berada pada rentang mW (Niemz, 2007). Instrumen LED yang dirancang telah memenuhi persyaratan untuk terjadinya mekanisme fotodinamik pada bakteri.

Hasil *t-test* menunjukkan bahwa penyinaran dengan LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm berbeda nyata dengan penyinaran

LED merah ( $629 \pm 6$ ) nm. LED biru menghasilkan penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio cholera* yang sebesar 70% dan 50%, lebih besar jika dibandingkan dengan penyinaran LED merah yang menurunkan jumlah koloni bakteri 22% dan 5%. Jadi penyinaran LED biru berpotensi *photodamage* untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio cholera*. Hal ini sesuai dengan penelitian Papageorgio *et al.* (2000), Askhenazi *et al.* (2003), dan Bonaficio (2006) yang menunjukkan bahwa Pita Soret, pita absorpsi yang intens untuk porphyrin pada range 390 – 430 nm. Iluminasi dengan cahaya biru menyebabkan kerusakan sel secara efisien (Nitzan *et al.*, 2004).

Mekanisme *photodamage* bakteri pada photodinamik inaktivasi bakteri melibatkan proses fotosensitisasi, yaitu proses penyerapan cahaya oleh porphyrin yang selanjutnya mengaktifkan reaksi dalam suatu substrat. Saat penyinaran cahaya, peristiwa yang berlangsung pertama kali adalah absorpsi foton cahaya oleh molekul porphyrin (Grossweiner, 2005). Peristiwa absorpsi primer berlangsung sangat cepat (sekitar  $10^{-15}$  s) diikuti dengan eksitasi molekul dari level vibrasional dalam keadaan dasar singlet elektronik  $S_0$  ke salah satu level vibrasional dalam keadaan eksitasi elektronik ( $^1\text{Sen}^*$ ). Eksitasi molekul menuju keadaan energi yang lebih tinggi ini tidak stabil sehingga akan kembali ke keadaan dasar, baik secara langsung maupun melibatkan terjadinya reaksi kimia (photokimia) melalui pembalikan spin (*intersystem crossing*) ke tingkat eksitasi triplet ( $^3\text{Sen}^*$ ). Photokimia merupakan perubahan kimia yang disebabkan oleh cahaya (Coyle, 1991), yang terjadi pada tingkatan molekuler akibat absorpsi oleh foton. Reaksi photokimia yang dimediasi oleh porphyrin paling banyak terjadi dari keadaan triplet tereksitasi. Gambar 3 menunjukkan reaksi photokimia.



**Gambar 3.** Reaksi photokimia selama PDI, Sen adalah *sensitizer*, ROOH adalah peroksida lipid,  $^1\text{O}_2$  adalah singlet oksigen, (Sharman *et al.*, 2000)

Mekanisme reaksi photokimia meliputi: Tipe 1, molekul photosensitif yang tereksitasi secara optis bereaksi secara langsung dengan substrat seperti seperti asam linoleic, membran sel atau molekul, dan mentransfer sebuah proton atau elektron untuk membentuk anion atau kation radikal. Radikal ini selanjutnya akan bereaksi dengan oksigen menghasilkan jenis oksigen reaktif (ROS) (Sharman *et al.*, 2000). Tipe 2, photosensitizer triplet dapat mentransfer energinya secara langsung pada molekul oksigen untuk membentuk oksigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ) tereksitasi. Beberapa investigasi menunjukkan bahwa mekanisme kerusakan sel oleh cahaya dimediasi oleh eksitasi porphyrin dan reaksi singlet oksigen (Johansen *et al.*, 2003). Singlet oksigen  $^1\text{O}_2$  teridentifikasi berpengaruh pada membran sitoplasma dan intraselular, terutama pada fosfolipid, kolesterol dan membran protein (Grossweiner, 2005).

Pada penelitian ini bakteri yang digunakan adalah bakteri Gram positif dan Gram negatif yang memiliki dinding sel yang berbeda sehingga potensi inaktivasi photodinamik juga menghasilkan persentase kematian bakteri yang berbeda. Hal ini sesuai dengan penelitian Hamblin dan Hasan (2004) yang melaporkan bahwa Singlet oksigen  $^1\text{O}_2$  menyebabkan kerusakan membran sitoplasma dan mengakibatkan kebocoran isi serta kandungan sel dan menginaktivasi sistem transport membran dan enzim-enzim serta penelitian Nitzan dan Kauffman (1999) yang melaporkan adanya kerusakan sintesis dinding sel dan tampaknya struktur multilamellar dekat septum pembagi sel seiring bocornya ion-ion potasium dari dalam sel dan mengakibatkan kematian sel (Demidova dan Hamblin, 2005).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio cholera* dengan endogen photosensitizer berpotensi photodinamik inaktivasi pada penyinaran LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada DP2M-Dikti Depdiknas yang telah mendanai penelitian ini melalui Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch II tahun 2009.

## KEPUSTAKAAN

- Ashkenazi, Malik Z, Harth Y, Nitzan, 2003. Eradication of *Propionibacterium acnes* by Its Endogenic Porphyrin after Illumination with High Intensity Blue Light, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35(2203): 17–24.
- Astuti SD, Puspitasari AT, Supriyanto A, 2009. The Optimal Lethal Dose of Blue Light (454 nm) Exposure with Light Emitting

- Diodes (LED) Device in *Staphylococcus aureus* Bacteria, *Second International conference and Workshops on Basic and Applied Sciences & Regional Annual Fundamental Science Seminar*, UTM, Malaysia.
- Bonaficio A, 2006. *Resonance Raman spectroscopy of human cytochrome P450 2D6: in solution and on nanostructured biocompatible metal surfaces*, Vrije Universit.
- Coyle JD, 1991. *Introduction to Organic Photochemistry*, John Wiley Sons: London.
- Demidova dan Hamblin, 2005. Effect of cell-Photosensitizer Binding cell Density on Microbial Photoinactivation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6): 2329–2335.
- Grossweiner LI, 2005. *The Science of Phototherapy: An Introduction*, Springer: USA.
- Hamblin dan Hasan T, 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, *Journal of Photochem & Photobiol, Science*, 3: 436–450.
- James WD, 2007. Acne *nejm*, 49: 218–226.
- Jawetz, Melnick, Alderberg's, 2001. *Medical Microbiology*, McGraw-Hill 22<sup>nd</sup> ed., 235–23.
- Johansen Y, Widerøe HC, Krane J, Johnsson A, 2003. Proton magic angle spinning NMR reveals new features in photodynamically treated bacteria, *Z. Naturforsch*, 58c: 401–407.
- Juanda A, 2005. *Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin*, Jakarta: FKUI.
- Juzenas P, 2002. *Investigation of Endogenous Photosensitizer Protoporphyrin IX in Hairless Mouse Skin by Means of Fluorescence Spectroscopy*, *Group of Photodynamic Therapy Departement of Biophysics*, Institute for Cancer Research The Norwegian Radium Hospital.
- Kennedy dan Pottier, 1992. Endogenous Porphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy, *Journal of Photochem & Photobiol. B*. 14: 275–292.
- Niemz MH, 2007. *Laser-Tissue Interaction, Fundamentals and Applications*, Third enlarged edition, Springer-Verlag Berlin.
- Nitzan dan Kauffman, 1999. Endogenous Porphyrin Production in Bacteria by  $\delta$ -ALA and subsequent Bacterial Photoeradication, *Lasers Med. Sci*, 14: 269–277.
- Nitzan dan Ashkenazi, 2001. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *E. coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths, *Curr. Microbiol*, 42: 408–414.
- Nitzan, Divon MS, Shporen E, Malik Z, 2004. ALA Induced Photodynamic Effect on Gram Positive and Negative bacteria, *Journal of Photochem. & Photobiol.*, 3: 430–435.
- Papageorgiu, Katsambas, Chu, 2000. Phototherapy with Blue (415nm) and Red (660nm) Light in The Treatment of Acne Vulgaris, *British Journal of Dermatology* 142: 973–97.
- Ross DA, 1979. *Optoelectronic Devices and Optical Imaging Techniques*, The Macmillan Press Ltd, p. 11–19.
- Sharman WM, Allen CM, Van Lier JE, 2000. Role of Activated Oxygen Species in Photodynamic Therapy, in: Packer L, Sies H., editors. *Methods in Enzimology*, vol. 319, New York Academy Press. p. 376–400.
- Schubert E.F., 2006. *Light Emitting Diodes*, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press, USA.

Reviewer: **Dr. Agung Bambang Setio Utomo, S.U.**